

Mutation of *ras* Genes Induced by 3-chloro-4-(dichloromethyl)-5-hydroxy-2[5H]-furanone in Human Fetal Hepatocytes

3-氯-4-二氯甲基-5-羟基-2(5氢)-呋喃酮诱导人胚胎肝细胞 *ras* 基因突变

ZHOU Li-hong, LIU Ai-lin, LU Wen-qing *

(Department of Occupational and Environmental Health and MOE Key Lab of Environment and Health, School of Public Health, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, Hubei, China)

周利红/刘爱林/鲁文清 *

(华中科技大学同济医学院公共卫生学院劳动卫生与环境卫生学系和教育部环境卫生与健康重点实验室,湖北 武汉 430030)

【摘要】背景与目的: 研究饮水氯化消毒副产物 3-氯-4-二氯甲基-5-羟基-2(5氢)-呋喃酮 (3-chloro-4-(dichloromethyl)-5-hydroxy-2[5H]-furanone, MX) 对体外培养的人胚胎肝细胞 (L-02 细胞) *ras* 基因突变的诱导。材料与方法: MX 染毒剂量为 300 μmol/L, 以二甲基亚砜 (DMSO) 做溶剂对照, 将 L-02 细胞连续染毒培养 12 d 后, 收获细胞提取基因组 DNA, 应用 PCR-克隆测序法检测 *ras* 基因 (*K-ras*、*H-ras*、*N-ras*) 12、13、61 密码子是否存在突变。结果: MX 染毒组 *H-ras* 基因 57 密码子的 GAT 置换成 GGT, 未检测到 *K-ras*、*N-ras* 及 *H-ras* 12、13、61 密码子突变, DMSO 溶剂对照组相应的 *ras* 基因目的片段均未检测到突变。结论: MX 可能诱导 L-02 细胞 *ras* 基因突变。

【关键词】 3-氯-4-二氯甲基-5-羟基-2(5氢)-呋喃酮; *ras* 基因; 基因突变

中图分类号: R394.6; R994.6

文献标识码: A

文章编号: 1004-616X (2006)03-0171-04

【ABSTRACT】 BACKGROUND & AIM: To study the mutation of *ras* genes induced by 3-chloro-4-(dichloromethyl)-5-hydroxy-2[5H]-furanone (MX) in human fetal hepatocytes (L-02) *in vitro*. MATERIAL AND METHODS: L-02 cells were treated consecutively with 300 μmol/L of MX for 12 days and genome DNA was extracted after cell harvesting. Dimethyl sulfoxide (DMSO) was used as solvent control. *Ras* genes (*K-ras*, *H-ras*, *N-ras*) sequences including 12, 13 and 61 codons were tested using the PCR-clone and sequencing with the genome DNA from the cells. RESULTS: *H-ras* gene 57 codon substitution from GAT to GGT in the MX-treated group was found, but 12, 13, 61 codons of *K-ras*, *H-ras*, *N-ras* were the same as the normal sequence. There was no mutation in the solvent control group. CONCLUSION: MX probably induced *ras* gene mutation of L-02 cells.

【KEY WORDS】 3-chloro-4-(dichloromethyl)-5-hydroxy-2[5H]-furanone; *ras* gene; gene mutation

3-氯-4-二氯甲基-5-羟基-2(5氢)-呋喃酮 (3-chloro-4-(dichloromethyl)-5-hydroxy-2[5H]-furanone, MX), 是饮用水氯化消毒副产物之一, 由氯与水源水中的有机腐殖酸作用生成。人体接触 MX 的途径主要为通过饮食和饮水摄入以及经过皮肤吸收。MX 在氯化自来水的含量仅为 2~67 ng/L^[1], 但是众多的体内体外实验均显示了 MX 的遗传毒性和致癌性, 国际癌症研究署 (IARC) 已将 MX 列为人类可能致癌物。MX 可致鼠伤寒

沙门氏菌 TA100 60%~87% 的检测菌落发生 GC→TA 置换^[2-4]; 致大肠杆菌 AT→CG 突变^[5]; 致中国仓鼠卵巢细胞 *HPRT* 基因 GC→TA 突变、AT→TA 颠换、GC 碱基对缺失、大片段缺失和插入^[6]。因此, MX 导致的基因改变可能是其遗传毒性机制的一个重要方面。

ras 基因是较早发现的与人类癌症发生较为密切的原癌基因, 30% 的人类癌症都发现有 *ras* 基因突变, 多种环境化学或物理致癌物、诱变剂已被证实能直接引

收稿日期: 2005-09-19; 修订日期: 2005-11-20

基金项目: 国家自然科学基金(No. 30170794)

作者简介: 周利红 (1979-), 女, 浙江省台州人, 硕士, 研究生, 研究方向: 遗传毒理。

* Correspondence to: LU Wen-qing Tel: 86-27-83692715; E-mail: luwq@mails.tjmu.edu.cn

起 *ras* 癌基因的活化。*ras* 基因家族包括 *H-ras*、*N-ras* 和 *K-ras* 3 个成员，它们的突变热点位于外显子 1 的 12、13 密码子和外显子 2 的 61 密码子。本次实验采用 PCR- 克隆测序法来检测 MX 对正常人类来源胚胎肝细胞 (L-02 细胞) *ras* 基因突变热点及其周围碱基的作用特点，试图探讨 MX 的致癌机制。

1 材料与方法

1.1 细胞系 L-02 细胞购自武汉大学中国典型培养物保藏中心。

1.2 主要试剂 MX(CAS 49-7329-970) 和二甲基亚砜(DMSO)(CAS 67-68-5)为 Sigma 公司产品; DMEM 培养基和胎牛血清为 Gibco 公司产品; 基因组 DNA 提取试剂盒为美国 Genra 公司产品; TaqDNA 聚合酶试剂盒、marker 为华美生物工程公司产品; dNTP, 大连宝生物工程公司产品; 正常熔点琼脂糖为美国 Amersham life science 公司产品。

1.3 主要仪器 CO₂ 培养箱购自上海福玛实验设备有限公司; PCR 仪, 德国 Biometra Biomedizinische Analytik GmbH 公司产品; DYY- III 7 型电泳仪, 北京市六一仪器厂产品; DF-23C 型电泳槽, 北京市东方特力科贸中心产品; 凝胶成像系统, 法国 VILBERLOURMAT 公司产品; ABI-377 型全自动 DNA 序列分析仪, 美国应用生物系统公司产品。

1.4 实验方法

1.4.1 细胞染毒 MX 染毒剂量为 300 μmol/L, 以 DMSO(10 ml/L)作为溶剂对照。取对数生长期的 L-02 细胞约 5 × 10⁶ 个于 100 ml 培养瓶中, 加入含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基和受试物, 置培养箱 (37 °C, 5% CO₂) 传代培养, 每次传代后重新染毒, 染毒时间为 12 d。

1.4.2 基因组 DNA 提取 按 Genra DNA 提取试剂盒提取 DNA, 其纯度和浓度用紫外分光光度计于波长 260 nm 和 280 nm 处测定, 纯度指标 A₂₆₀/A₂₈₀ 在 1.8 以上, 最后将 DNA 浓度调至 0.1 μg/μl。

1.4.3 引物的设计与合成 根据 *K-ras*、*N-ras* 和 *H-ras* 的外显子 1 和外显子 2 序列分别设计 6 对引物, 引物序列见表 1, 引物由上海博亚生物技术有限公司合成。

1.4.4 PCR 扩增 PCR 扩增的反应体系为: 50 μl 反应体系中去离子水 33 μl, 10 × Buffer (不含 MgCl₂) 5 μl, MgCl₂ (25 mmol/L) 3 μl, 4 × dNTP 混合物 (每种 2.5 mmol/L) 4 μl, 上游引物 (20 μmol/L) 1 μl, 下游引物 (20 μmol/L) 1 μl, 模板 (0.1 μg/μl) 2 μl, TaqDNA 聚合酶 (3U/μl) 1 μl。反应参数见表 2。

表 1 PCR 引物序列及 PCR 产物长度

Table 1 Primer sequences and product size for PCR

Gene	Oligonucleotide primer 5'-3'	Product size
<i>K-ras</i> exon 1	(F) 5'-aggggattctctggtggagtattgata -3'	289 bp
	(R) 5'-aggggaattccctgcaccagtaataatgc -3'	
<i>K-ras</i> exon 2	(F) 5'-ggatattctcgacacacagc -3'	63 bp
	(R) 5'-gtcctcatgtactgttcc -3'	
<i>H-ras</i> exon 1	(F) 5'-ataagctggtgggtggg -3'	52 bp
	(R) 5'-atggtcagcgcactcttg -3'	
<i>H-ras</i> exon 2	(F) 5'-ggaagcaggtggtcattg -3'	144 bp
	(R) 5'-gactggtgtgttgalgg -3'	
<i>N-ras</i> exon 1	(F) 5'-aacgtggtgggtggac -3'	62 bp
	(R) 5'-ctggattagctggattgca -3'	
<i>N-ras</i> exon 2	(F) 5'-ttggacatactggatacagc -3'	60 bp
	(R) 5'-catgtattggtctctcatgg -3'	

表 2 *ras* 基因 PCR 反应参数

Table 2 PCR reaction parameters of *ras* genes

Gene	Cycle parameters			Cycle number
<i>K-ras</i> exon 1	94°C 1min	55°C 2min	72°C 3min	30
<i>K-ras</i> exon 2	94°C 1min	59°C 50 s	72°C 1min	30
<i>H-ras</i> exon 1	94°C 45 s	63°C 30 s	72°C 1min	35
<i>H-ras</i> exon 2	94°C 50 s	62°C 30 s	72°C 70 s	35
<i>N-ras</i> exon 1	94°C 1min	61°C 50 s	72°C 1min	30
<i>N-ras</i> exon 2	94°C 1min	62°C 40 s	72°C 1min	35

1.4.5 PCR 产物克隆测序 PCR 产物纯化后进行 TA 克隆测序, 由上海申友生物技术有限责任公司协助完成。

2 结果

2.1 对照组 L-02 细胞 *ras* 基因目的片段序列的分析 DMSO 溶剂对照组 L-02 细胞 DNA 测序结果显示所有 *ras* 基因目的片段的碱基序列都和人类 *ras* 基因的正常序列相同, 未见 DMSO 对 L-02 细胞存在致 *ras* 基因突变的特性。

2.2 MX 染毒组 L-02 细胞 *ras* 基因目的片段序列分析 结果见图 1 和图 2。与溶剂对照组对比, MX 染毒组 L-02 细胞中存在 *H-ras* 基因突变细胞, 其突变类型为外显子 2 的 57 密码子由 GAT 置换成 GGT。该组 L-02 细胞的 *K-ras* 外显子 1、外显子 2, *N-ras* 外显子 1、外显子 2, *H-ras* 外显子 1 测序结果未显示突变的存在。

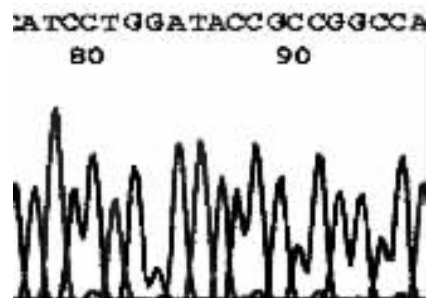


图 1 溶剂对照组 *H-ras* 基因外显子 2 部分序列分析图

Figure 1 Subsequence of *H-ras* gene exon 2 in solvent control group
Note: *H-ras* gene's 57 codon is from 83 to 85 bp in the figure.

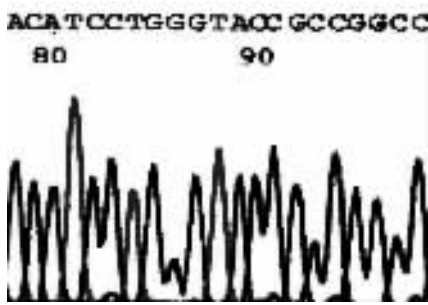


图 2 MX 染毒组 *H-ras* 基因外显子 2 部分序列

Figure 2 Subsequence of *H-ras* gene exon 2 in MX-treated group
Note: *H-ras* gene's 57 codon is from 86 to 88 bp in the figure.

3 讨论

ras 基因在早期就被发现可以导致正常细胞恶性转化,在被持续激活后具有细胞转化功能。其激活方式有点突变、基因过度表达、基因插入和转位等。本实验室运用原位杂交技术研究终浓度为 10、30、100 和 300 $\mu\text{mol/L}$ 的 MX 染毒 L-02 细胞 1 h *ras* 基因的表达水平,结果显示,与 DMSO 溶剂对照相比,30、100 和 300 $\mu\text{mol/L}$ 的 MX 能明显增加 *ras* 基因表达水平^[7]。由此推断 MX 可诱导 L-02 细胞 *ras*-mRNA 的表达,*ras* 基因可能参与 MX 的致癌过程。为进一步探讨 *ras* 基因涉及的 MX 致癌作用机制,本研究采用最高终浓度 300 $\mu\text{mol/L}$ 进行 *ras* 基因点突变的检测。此浓度比已报道的氯化自来水中 MX 的浓度^[1]高 5~7 个数量级,鉴于人体长期摄入的蓄积作用以及立足建立 MX 致突变模型的出发点而作此选择。

点突变是 *ras* 基因活化的主要方式,其本质就是基因序列中某些高度进化保守区中的某一核苷酸发生了变化。*ras* 基因 12、13、61 位密码子碱基是突变热点,59、63、116、119 位密码子也是活化突变的潜在位点。另外国内外陆续有新位点突变的报道,Tong Y 等曾发现 *H-ras* 基因 56、117 位密码子突变^[8]。1998 年澳大利亚 Shahin 等在欧洲蕨致 SP 大鼠乳腺癌前组织中检测到 *H-ras* 基因 58、59 密码子联合突变^[9]。Lin 等在肾脏肿瘤中发现 *K-ras* 基因除了在氨基酸密码子第 12、13、61 位置突变外,在第 15、16、18 及 31 位置也有发现^[10]。2000 年日本 Tsukuda 在原发性结肠腺癌中检测到 *K-ras* 基因 22 位密码子突变,文中还提到 10、11、15、18 密码子突变的发现^[11]。同年美国学者 Chakravarti 发现 dibenzo[a,1] pyrene 诱导的癌前组织中 *H-ras* 基因 52 密码子 A→G 突变^[12]。2002 年顾其华等发现大肠癌组织中 *K-ras* 基因 6、31、79 位密码子突变^[13]。可见 *ras* 基因突变并非局限于突变热点,其突变谱较广,不同的种属、不同的致癌原因(如致癌物质的差异)、肿瘤的不同阶段都会导致突变差

异。本次实验结果显示经 MX 染毒 12 d 的 L-02 细胞,其 *ras* 基因 3 个成员的突变热点 12、13、61 密码子均未发生突变,而在 *H-ras* 基因 57 密码子存在 AT→GC 取代,使 57 位氨基酸由甘氨酸变成了缬氨酸。此突变尚未见有报道,为一新的突变位点,这或许跟受试物以及选择的细胞类型有关,此突变位点位于外显子上的进化保守区,其对 *ras* 基因功能的影响还需深入研究。

ras 基因突变存在一定的组织特异性,也就是优势激活现象,如胰腺癌、肠癌以 *K-ras* 基因突变为主,血液系统肿瘤以 *N-ras* 基因突变为主,而 40% 肝癌 *ras* 基因突变都发生在 *H-ras* 基因。在 N- 羟基-2'- 乙酰基氟化物、乙烯氨基甲酸酯、1- 羟基-2'-3'- 脱氢草蒿脑或呋喃甲醛诱导的 B₆ C₃ F₁ 小鼠肝癌中几乎 100% 发现有活化的 *H-ras* 癌基因^[14]。本次实验根据 MX 的主要靶器官之一的肝脏而选择肝细胞,其结果 *H-ras* 基因突变的发现与 *ras* 此特性相吻合。但是对于 AT→GC 突变的机理尚需进一步的研究。MX 已被证实可以形成腺嘌呤加合物,那么由此引发的 DNA 修复过程中胞嘧啶的错误掺入会导致 AT→GC 突变^[15,16]。当然 DNA 氧化损伤标志物 8- 羟基脱氧腺嘌呤 (8-OHdA) 也可能参与此过程,动物实验证实 MX 对大鼠的氧化应激与其 DNA 损伤存在相关性^[17],再者人为合成的 61 位密码子含 8-OHdA 的 *H-ras* 基因片断转染至鼠成纤维细胞 (N3T3) 可致 A→G 和 A→C 的转换^[18]。

本实验显示 MX 可诱导 *H-ras* 基因 57 密码子突变,此突变的功能意义及其与 MX 致癌的潜在联系可能为 MX 致癌的作用机制提供有意义的素材。

参考文献:

- [1] Reproductive and Cancer Hazard Assessment Section Office of Environmental Health Hazard Assessment California Environmental Protection Agency. Evidence on the carcinogenicity of MX (3-chloro-4-(dichloromethyl)-5-hydroxy-2(5H)-furanone) [Z]. Draft August 2000.
- [2] DeMarini DM, Abu-Shakra A, Felton CF, et al. Mutation spectra in salmonella of chlorinated, chloraminated, or ozonated drinking water extracts: comparison to MX [J]. *Environ Mol Mutagen*, 1995, 26(4):270-85.
- [3] DeMarini DM, Landi S, Ohe T, et al. Mutation spectra in Salmonella of analogues of MX: implications of chemical structure for mutational mechanisms [J]. *Mutat Res*, 2000, 453(1):51-65.
- [4] Knasmüller S, Zohrer E, Kronberg L, et al. Mutational spectra of Salmonella typhimurium revertants induced by chlorohydroxyfuranones, byproducts of chlorine disinfection of

- drinking water[J]. *Chem Res Toxicol*, 1996, 9(2): 374-381.
- [5] Lu C, Yagi H, Jerina DM, *et al.* Chapter 3. Mutational spectra of the four bay-region diol epoxides of benzo(c) phenanthrene and the drinking water mutagen, MX, determined with an improved set of E. Coli lacZ- mutants [M]. In *Miner RA, Ford AM, Needham LL, Karch NJ (eds.) Applications of Molecular Biology in Environmental Chemistry. First Edition. Boca Raton: CRC Lewis Publishers, 1995, 35-44.*
- [6] Jansson K, Hyttinen JM. Induction of gene mutation in mammalian cells by 3-chloro-4-(dichloromethyl-5-hydroxy-2(5H)-furanone (MX), a chlorine-disinfection byproduct in drinking water[J]. *Mutat Res*, 1994, 322(2):129-132.
- [7] 刘爱林,吴建军,邹亚玲,等. 3-氯-4-二氯甲基-5-羟基-2(5-氢)-呋喃酮对 L-02 细胞 DNA 损伤与 ras 基因表达的影响[J]. *卫生毒理学杂志*, 2004, 18(4):207-209.
- [8] Tong Y, Tucker SB, Smith MA. Expression of Hras-p21 and keratin K13 in UVR-induced skin tumors in Sencar mice[J]. *J Toxicol Environ Health A*, 1998, 53(6):439-53.
- [9] Shahin M, Moore MR, Worrall S, *et al.* H-ras Activation Is an Early Event in the Ptquiloside-Induced Carcinogenesis: Comparison of Acute and Chronic Toxicity in Rats[J]. *Biochemi biophys res communi*, 1998, 250(2):491-497.
- [10] Lin SR, Tsai JH, Yang YC, *et al.* Mutations of K-ras oncogene in human adrenal tumors in Taiwan[J]. *Br J Cancer*, 1998, 77(7):1060-5.
- [11] Tsukuda K, Tanino M, Soga H, *et al.* A Novel Activating Mutation of the K-ras Gene in Human Primary Colon Adenocarcinoma[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2000, 278(3):653-658.
- [12] Chakravarti D, Mailander PC, Cavalieri EL, *et al.* Evidence that error-prone DNA repair converts dibenzo[a, 1] pyrene-induced depurinating lesions into mutations: formation, clonal proliferation and regression of initiated cells carrying H-ras oncogene mutations in early preneoplasia[J]. *Mut Res*, 2000, 456(1-2):17-32.
- [13] 顾其华,舒畅,李永平,等. 大肠癌 K-ras 和 p53 基因序列分析[J]. *中华医学遗传学杂志*, 2002, 19(3):264-265.
- [14] 吕中明,杨永年. Ras 癌基因与化学致癌剂诱导的肿瘤[J]. *国外医学卫生学分册*, 1994, 21(5):272-275.
- [15] Le Curieux F, Munter T, Kronberg L. Identification of adenine adducts formed in reaction of calf thymus DNA with mutagenic chlorohydroxyfuranones found in drinking water[J]. *Chem Res Toxicol*, 1997, 10(10):1180-1185.
- [16] Munter T, Le Curieux F, Sjöholm R, *et al.* Reaction of the potent bacterial mutagen 3-chloro-4-(dichloromethyl)-5-hydroxy-2(5H)-furanone (MX) with 2'-deoxyadenosine and calf thymus DNA: identification of fluorescent propenoformyl derivatives [J]. *Chem Res Toxicol*, 1998, 11(3):226-233.
- [17] 刘慧,袁晶,邹亚玲,等. 3-氯-4-二氯甲基-5-羟基-2(5-氢)-呋喃酮对小鼠的遗传毒性与氧化损伤的关系[J]. *癌变·畸变·突变*, 2005, 17(2):83-86.
- [18] Kamiya H, Miura H, Murata-Kamiya N, *et al.* 8-Hydroxyadenine (7,8-dihydro-8-oxoadenine) induces misincorporation in in vitro DNA synthesis and mutations in NIH 3T3 cells[J]. *Nucleic Acids Res*, 1995, 23(15):2893-2899.

消息:

第四届环境与职业医学国际学术研讨会将于 10 月中旬在昆明召开

由环境与职业医学杂志编委会、上海市疾病预防控制中心与美国加州卫生局及昆明医学院等中美多方联合主办的“第四届环境与职业医学国际学术研讨会”，将于 2006 年 10 月中旬在云南省昆明市召开。大会组委会于 3 月 20 日发出了研讨会征文通知，其征文内容范围：

①生态环境与人类健康；②健康城市与社会和谐；③生命质量与健康指标；④工业卫生与环境化学；⑤健康危害变化趋势及环境与职业流行病学；⑥有害健康危险度评价、污染控制和防治技术；⑦毒理学研究和环境、职业医学实验检测技术；⑧室内外环境污染、公害病和环境相关疾病；⑨职业病危害因素、职业病和职业相关疾病；⑩环境基因组学、蛋白组学；⑪突发公共卫生事件与应急救援；⑫职业相关社会心理问题和环境应急心理危机；⑬环境与职业卫生事业管理；⑭公共卫生经济学与社会医学；⑮公共卫生法制与社会热点问题。组委会要求征文须是尚未在国内外正式期刊上发表过的科技论文，并在提交的每篇中文征文后，附中文全文的英文译文（至少须经 1 名专家审校）。并通知作者征文的电子版请发至 Email 邮箱：JEOM2006@yahoo.com.cn 和 zazhi2@scdc.sh.cn；也可将打印稿一份（需附电子文件）寄至：200336，上海市中山西路 1380 号《环境与职业医学》杂志编辑部收。联系电话：021-62758710-1324 或 1326 分机；直线及传真：021-62084529；联系人：洪琪，丁瑾瑜。接收征文截止时间为 2006 年 7 月 1 日（以邮戳或电子邮件为准）。

《癌变·畸变·突变》编辑部